

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS VENENOS DE SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS*, PROCEDENTES DO ESTADO DE SÃO PAULO E DO ESTADO DO PARANÁ COM ALGUMAS ESPÉCIES MORFOLOGICAMENTE DUVIDOSAS

Maria Amélia Lopes PERRONE*

Medardo SILES VILLARROEL**

Maria de Fátima Domingues FURTADO***

RESUMO: Os venenos de serpentes *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu* procedentes do Estado de São Paulo, foram comparados com os venenos das mesmas espécies procedentes da região de Itaipu, Estado do Paraná e de alguns exemplares de serpentes de Itaipu com características morfológicas entre *B. moojeni* e *B. neuwiedi* e entre *B. moojeni* e *B. jararacussu*. Os parâmetros analisados foram: letalidade, eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, imunodifusão e imunoeletroforese. Os valores da DL₅₀ dos venenos das espécies *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, não apresentam diferenças significativas quanto à letalidade; contudo, os venenos de *B. jararacussu* apresentam diferenças, sendo que os espécimes de São Paulo possuem letalidade mais elevada em relação aos de Itaipu. Os venenos de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* procedentes das duas regiões não apresentaram variações em seus padrões eletroforéticos, já os venenos de *B. jararacussu* apresentaram algumas diferenças nos eletroferogramas. Os exemplares de serpentes de Itaipu com características morfológicas entre *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (*Bothrops* sp 1) e entre *B. moojeni* e *B. jararacussu* (*Bothrops* sp 2), quanto ao perfil eletroforético, assemelham-se ao veneno da espécie *B. moojeni*. A análise dos componentes imunogênicos dos venenos das três espécies, através das técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese, não apresentam variações apreciáveis.

UNITERMOS: — Letalidade, imunoquímica, venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

Trabalhos anteriores demonstraram que ocorrem variações intraespecíficas na composição dos venenos, em função da distribuição geográfica (Jiménez-Porras, 1964, 1967; Aragon & Gubensek, 1981; Glenn et al, 1983; Rael et al, 1984).

* Bolsista da FUNDAP — Seção de Venenos do Instituto Butantan.

** Professor Adjunto do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

*** Pesquisador Científico da Seção de Venenos do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência: Departamento de Imunologia — Edifício Biomédicas III — Cidade Universitária — CEP 05508 — São Paulo — Brasil.
Instituto Butantan — CP 65-01051 — São Paulo — Brasil.

Recebido para publicação em 29-3-1988 e aceito em 3-11-1988.

Estas variações bioquímicas e farmacológicas mostram diferenças significativas em algumas propriedades tais como a letalidade, atividade enzimática, padrões eletroforéticos, efeitos locais, reações imunológicas e outras (Minton, 1967, 1975; Fiero et al, 1972; Bonilla et al, 1973; Gutiérrez & Chaves, 1980).

O gênero *Bothrops*, com ampla distribuição pelas Américas Central e do Sul, é o grupo de serpentes peçonhentas mais importante em número de espécies e densidade populacional, sendo responsável por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos na casuística do Hospital Vital Brasil (Instituto Butantan, Hospital Vital Brazil, 1982).

Há poucos estudos comparativos dos venenos, relativos à distribuição geográfica destes animais, no território nacional (Gonçalves & Vieira, 1950; Gonçalves & Deustsch, 1956, Schenberg, 1959).

Contando com centenas de serpentes capturadas durante o represamento das águas da Usina de Itaipu, no Estado do Paraná, e classificadas no Instituto Butantan como pertencentes às espécies *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu*, e alguns exemplares que apresentavam características morfológicas entre *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi* e outros entre *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu*, propusemo-nos a estudar comparativamente os venenos dos animais pertencentes a esta região com os venenos das mesmas espécies procedentes do Estado de São Paulo, quanto à:

1. Determinação da letalidade dos venenos em camundongos inoculados pela via intraperitoneal e seus resultados expressos em DL_{50} ;
2. Verificação do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida com SDS, dos venenos;
3. Verificação dos componentes imunológicos, através das reações de imunodifusão e imunoeletroforese.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Venenos utilizados

Foram utilizados os venenos das espécies de serpentes *B.moojeni* (Hoge, 1965); *B.neuwiedi* (Wagler in Spix, 1924) e *B.jararacussu* (Lacerda, 1884) procedentes do Estado de São Paulo e de Itaipu (Noroeste do Estado do Paraná); e desta mesma procedência os venenos dos espécimes que apresentam características morfológicas entre *B.moojeni* e *B.neuwiedi* denominados por nós *Bothrops* sp 1 e os venenos de espécimes com características do *B.moojeni* e *B.jararacussu* denominados de *Bothrops* sp 2. Estes venenos foram obtidos de vários exemplares adultos, por extração manual, secos à vácuo e mantidos na geladeira a $\pm 4^{\circ}C$, fornecidos pela Seção de Venenos do Instituto Butantan.

Os venenos foram preparados a 1% em solução salina estéril a 0,85% e centrifugados a 5000 rpm durante 20 minutos a $15^{\circ}C$, para eliminar eventuais impurezas em suspensão. Os sobrenadantes foram distribuídos em tubos de ensaio, em volumes de 1ml cada e mantidos, no congelador, a $-25^{\circ}C$.

No momento do uso, procedia-se ao descongelamento.

2. Determinação da letalidade dos venenos

2.1. Animais utilizados, via de inoculação e volume inoculado

Empregamos camundongos brancos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), Swiss Webster, de ambos os sexos, adultos jovens pesando 20 ± 2 gramas, procedentes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, considerados animais convencionais, nos quais inoculamos 0,5ml de cada dose, pela via intraperitoneal. Os lotes de camundongos foram em número de cinco por dose.

2.2 — Período de observação

Os camundongos foram observados nos períodos de 24 horas e 48 horas após as respectivas inoculações.

2.3 — Cálculo da DL₅₀

A determinação da toxicidade dos venenos estudados foi calculada através do método de Spearman-Kärber, descrito e recomendado pela OMS (1981).

3. Eletroforese, imunodifusão e imunoeletroforese

3.1 — Para a eletroforese em gel de poliacrilamida em placa, utilizou-se basicamente o método preconizado por Laemmli (1970), que consiste, em linhas gerais, de um gradiente em acrilamida de 8-16%, com SDS, aplicando-se 20 microlitros (200 ug) de solução de veneno em cada canaleta. Submeteu-se a 200V, corrente de 7,5mA inicial, seguida de 15mA durante 6 horas. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue-R250 durante 24 horas, descorado com solução de etanol, ácido acético e água (1:2:20), e conservado em solução de ácido acético a 7%.

Para a densitometria, a placa de gel foi fotografada em Kodak, procedendo-se a leitura no densitômetro Ata 60, filtro 500mV, abertura 7 e velocidade de 100mm por minuto.

3.2 — Para a imunodifusão e imunoeletroforese foi utilizado o método descrito por Siles Villarroel (1972); Siles Villarroel et al. (1974).

RESULTADOS

Os resultados da letalidade dos oito venenos estudados, provenientes do Estado de São Paulo e Itaipu (Paraná), constam na Tabela I.

TABELA I

Resultados da DL₅₀ obtidos pelo método de Spearman-Kärber dos venenos estudados.

Veneno das Espécies	Procedência	DL ₅₀ — Spearman-Kärber	
		ug/camundongo	Variação 95% de confiança
<i>B. moojeni</i>	São Paulo	115,81	99,69 — 134,54
<i>B. moojeni</i>	Itaipu	110,07	98,66 — 112,80
<i>B. neuwiedi</i>	São Paulo	46,64	41,34 — 52,62
<i>B. neuwiedi</i>	Itaipu	58,33	52,03 — 65,40
<i>B. jararacussu</i>	São Paulo	78,25	72,84 — 84,06
<i>B. jararacussu</i>	Itaipu	116,68	105,68 — 128,82
<i>Bothrops sp 1</i>	Itaipu	137,40	123,34 — 153,07
<i>Bothrops sp 2</i>	Itaipu	123,38	118,05 — 128,96

A Tabela 1 resume os valores das DL_{50} , quanto à letalidade dos venenos. Segundo o método de Spearman-Kärber, os valores expressos com os intervalos de confiança de 95% demonstram que não encontramos diferenças significativas quando comparamos os venenos de *Bothrops moojeni* de São Paulo e Itaipu; o mesmo ocorreu com os venenos de *Bothrops neuwiedi*.

Encontramos diferenças bastante significativas, quando comparamos os valores da DL_{50} dos venenos de *Bothrops jararacussu* de São Paulo e Itaipu.

A letalidade dos venenos dos exemplares com características morfológicas entre *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (denominado por nós de *Bothrops* sp 1) está mais próxima da DL_{50} do veneno de *B. moojeni* do que a DL_{50} do veneno de *B. neuwiedi* procedentes de Itaipu.

A letalidade dos venenos com características morfológicas entre *B. moojeni* e *B. jararacussu* (denominado de *Bothrops* sp 2) está próxima da DL_{50} dos venenos de *B. jararacussu* e *B. moojeni* procedentes de Itaipu.

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS para os oito venenos estudados estão expressos na Fig. 1.

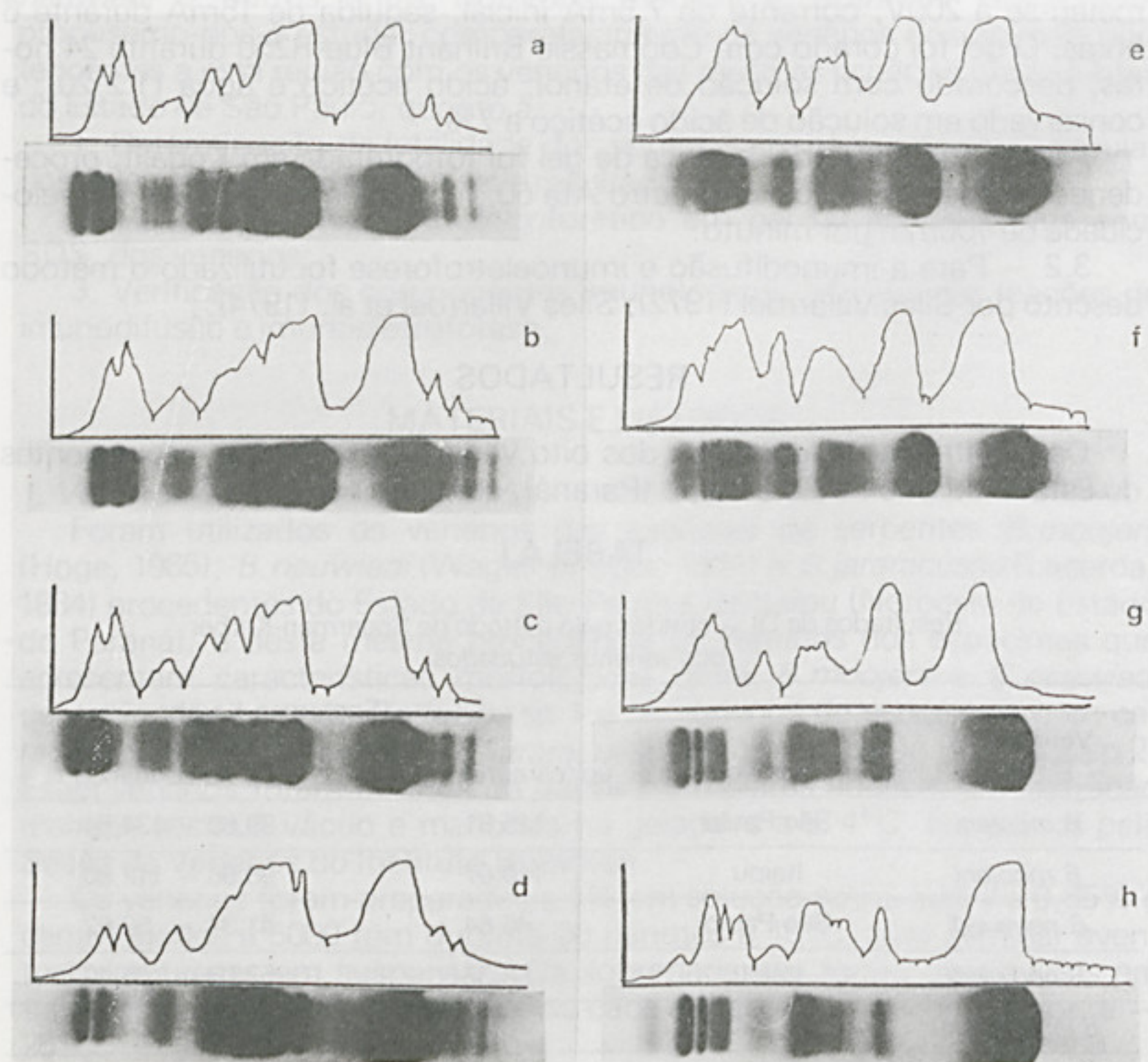


FIGURA 1 — Curvas densitométricas e eletroferogramas dos venenos de: a — *B. moojeni* — São Paulo, b — *B. moojeni* — Itaipu, c — *Bothrops* sp 1 — Itaipu, d — *Bothrops* sp 2 — Itaipu, e — *B. neuwiedi* — São Paulo, f — *B. neuwiedi* — Itaipu, g — *B. jararacussu* — São Paulo, h — *B. jararacussu* — Itaipu.

Os resultados da eletroforese dos venenos de *B. moojeni* procedentes do Estado de São Paulo e de Itaipu (Paraná) apresentam o mesmo número e localização das bandas, demonstrando que não há diferenças apreciáveis entre os venenos comparados (Fig. 1a e b). As mesmas observações foram verificadas com os venenos de *B. neuwiedi* (Fig. 1e e f).

Os venenos de *B. jararacussu* procedentes das diferentes localidades apresentam pequenas variações, principalmente relacionadas à concentração, isto se observa no penúltimo componente dos padrões eletroforéticos (Fig. 1g e h).

O perfil eletroforético (c) do veneno de serpentes com características morfológicas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, denominado por nós *Bothrops* sp 1, assemelha-se aos padrões eletroforéticos de *B. moojeni* de São Paulo e Itaipu (a e b) e difere bastante dos venenos de *B. neuwiedi* (e e f).

O perfil eletroforético (d) do veneno de serpentes com características morfológicas de *B. moojeni* e *B. jararacussu*, denominado por nós *Bothrops* sp 2, assemelha-se aos padrões eletroforéticos de *B. moojeni* de São Paulo e Itaipu (a e b), apresentando concentrações menores para os dois primeiros componentes e diferindo bastante dos venenos de *B. jararacussu* (g e h).

Os resultados do estudo comparativo entre os oito venenos, através das técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese, não incluídos, não apresentam variações ponderáveis.

DISCUSSÃO

A despeito da comprovação da extensa variabilidade dos venenos em serpentes (Gloyd, 1940; Gonçalves & Vieira, 1950; Gonçalves & Deustsch, 1956; Schenberg, 1959; Aragon e Gubensek, 1981; Rael et al., 1984), vários autores como Jiménez-Porras (1964, 1967) concluem que as variações nos venenos são de origem genética. E Saint-Girons & Detrait (1978), estudando a antigenicidade dos venenos das serpentes européias, coloca-os como caracteres válidos para fins sistemáticos.

Furlaneto et al. (1973) e Siles Villarroel (1977), estudando a DL_{50} dos venenos botrópicos, demonstraram que o veneno de cada espécie de serpente possui uma determinada letalidade conforme a via de inoculação e animal experimentado.

Siles Villarroel (1977) e Siles Villarroel et al. (1978/79), trabalhando com venenos procedentes de várias regiões, encontraram para *B. moojeni* a DL_{50} de 105,50 ug, enquanto que os valores da DL_{50} por nós obtidos para a mesma espécie procedente de São Paulo foram de 112,00 ug e de 99,71 ug para Itaipu. Os mesmos autores determinaram a DL_{50} para *B. neuwiedi* de 54,17 ug, sendo os nossos valores 46,0 ug e 62,08 ug, respectivamente. O veneno de *B. jararacussu* apresentou, para os autores loc. cit., o valor de 103,79 ug e os nossos resultados foram de 76,38 ug e 121,89 ug, demonstrando que nos venenos desta espécie ocorre variação mais ampla de letalidade e os espécimes de São Paulo possuem ação mais elevada.

Quanto aos venenos dos espécimes com características morfológicas entre *B. moojeni* e *B. neuwiedi* denominado de *Bothrops* sp 1 com DL_{50} de 137,40 ug está mais próximo à letalidade dos venenos de *B. moojeni* de São Paulo e Itaipu (DL_{50} = 115,81 ug e 110,07 ug, respectivamente) e muito distante da DL_{50} dos venenos de *B. neuwiedi* das duas localidades (DL_{50} =

46,64 ug e 58,33 ug), sugerindo tratar-se da espécie de *B. moojeni* quando analisado conjuntamente com os resultados da eletroforese.

Quanto aos venenos dos espécimes com características morfológicas entre *B. moojeni* e *B. jararacussu* denominado de *Bothrops* sp 2 com DL_{50} de 123,38 ug está próximo tanto da letalidade dos venenos de *B. moojeni* de São Paulo e Itaipu (DL_{50} = 115,81 ug e 110,07 ug) quanto da letalidade do veneno de *B. jararacussu* procedente de Itaipu (DL_{50} = 116,68 ug). Também neste caso a letalidade por si só é insuficiente para definir a espécie, porém quando analisada conjuntamente com os resultados da eletroforese sugere tratar-se da espécie *B. moojeni*.

Com relação à eletroforese, Gonçalves & Vieira (1950), analisando os venenos de serpentes brasileiras, verificaram variações geográficas nos de *Crotalus durissus terrificus*, demonstrando que os venenos procedentes do Sul do Brasil e da Argentina apresentam crotamina, enquanto que os de outras regiões não apresentam. Aragon & Gubensek (1981) observaram que o veneno de *Bothrops asper* diferia em função de sua zona de ocorrência.

Os venenos de *B. moojeni* procedentes de São Paulo e Itaipu não demonstraram diferenças quanto aos perfis eletroforéticos, o mesmo ocorrendo com os venenos de *B. neuwiedi*; já a espécie *B. jararacussu* de São Paulo e Itaipu apresenta pequenas variações nos padrões eletroforéticos.

E os venenos de *Bothrops* sp 1 e *Bothrops* sp 2 assemelham-se ao perfil eletroforético de *B. moojeni*.

Schenberg (1963), em estudo comparativo entre os venenos de subespécies de *B. neuwiedi* brasileiras, utilizou a técnica de imunodifusão, encontrando diferenças imunológicas nestes venenos. Tu & Ganthavorn (1968), comparando os venenos de *Naja naja siamensis* e *Naja naja atra*, encontraram padrões idênticos de imunodifusão e ligeiras diferenças nos padrões imunoeletroforéticos, indicando que estas subespécies são similares mas não idênticas.

Com os venenos das três espécies procedentes de regiões diferentes, utilizando as técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese, obtivemos resultados semelhantes entre as espécies, não ocorrendo variação significativa quanto ao número de linhas de precipitação.

CONCLUSÕES

1. Os venenos de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* procedentes da região de Itaipu e do Estado de São Paulo não apresentam diferenças significativas dentro de cada espécie, quanto à letalidade e aos padrões eletroforéticos.

2. Os venenos de *B. jararacussu* procedentes das duas regiões apresentam diferenças significativas quanto à letalidade, sendo mais ativos os venenos de São Paulo em relação aos venenos de Itaipu, quanto aos padrões eletroforéticos não apresentam diferenças significativas.

3. Os exemplares de serpentes de Itaipu com características morfológicas entre *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (*Bothrops* sp 1) e entre *B. moojeni* e *B. jararacussu* (*Bothrops* sp 2), quanto ao perfil eletroforético, assemelham-se ao veneno da espécie *B. moojeni*.

4. A análise dos componentes imunogênicos dos venenos das três espécies através das técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese não apresenta variações apreciáveis.

PERRONE, M.A.L.; SILES VILLARROEL, M.; FURTADO, M. de F.D. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná com algumas espécies morfologicamente duvidosas. *Mem. Inst. Butantan*, 51:(1):25-32, 1989.

ABSTRACT: The venoms of *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* and *Bothrops jararacussu* from the State of São Paulo, were compared to samples from the Itaipu region, State of Paraná as a whole. Some of the specimens from Itaipu present morphological aspects of both *B. moojeni* and *B. neuwiedi* and some others of both *B. moojeni* and *B. jararacussu*. Their toxic activity (DL₅₀), SDS polyacrylamide gel electrophoresis, immunodiffusion and immunoelectrophoresis patterns were assayed. The DL₅₀ values of *B. moojeni* and *B. neuwiedi* venoms showed no difference in toxicity. However, the venoms of *B. jararacussu* of the Itaipu region differed from those of São Paulo specimens, which showed higher toxicity. The electrophoretic patterns of the venoms of *B. moojeni* and *B. neuwiedi* from both regions showed no significant variation in the electropherograms. Possible intergrade specimens of *B. neuwiedi*/*B. moojeni* (B.sp 1) and *B. jararacussu*/*B. moojeni* (B.sp 2) venom samples had *B. moojeni* characteristics. The immunogenic components of the three venoms showed no apparent variation.

KEYWORDS: toxicity, immunochemistry, botropic venoms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAGON, F. & GUBENSEK, F. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. *Toxicon*, 19: 797-805, 1981.
2. BONILLA, C.A.; FAITH, M.R.; MINTON Jr., S.A. L amino acid oxidase, phosphodiesterase, total protein and other properties of juvenile timber rattlesnake (*C.h. horridus*) venom at different stages of growth. *Toxicon*, 11: 301-303, 1973.
3. FIERO, M.K.; SEIFERT, M.W.; WEAVER, T.J.; BONILLA, C.A. Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venoms. *Toxicon*, 10: 81-82, 1972.
4. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL₅₀ de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus*-Linnaeus, 1758.
II — Possibilidade de determinação da DL₅₀ através da inoculação prévia de doses infraletais do próprio veneno. *Mem. Inst. Butantan*, 37: 109-122, 1973.
5. GLENN, J.L.; STRAIGHT, R.C.; WOLFE, M.C.; HARDY, D.L. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. *Toxicon*, 21(1): 119-130, 1983.
6. GLOYD, H.K. The Rattlesnakes, Genera *Sistrurus* and *Crotalus*. Chicago Academy of Sciences Special publication n° 4, 1940.
7. GONÇALVES, J.M. & DEUSTSCH, H.F. Ultracentrifugal and zone electrophoresis on some Crotalidae venoms. *Arch. Biochem. Biophys*, 60: 402-411, 1956.
8. GONÇALVES, J.M. & VIEIRA, L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I — Análise eletroforética. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 22: 141-150, 1950.
9. GUTIÉRREZ, J.M. & CHAVES, F. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon*, 18: 315-321, 1980.
10. INSTITUTO BUTANTAN, HOSPITAL VITAL BRASIL. Manual para atendimento dos acidentes humanos por animais peçonhentos. São Paulo, 1982.
11. JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. Intraspecific variations in composition of venoms of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. *Toxicon*, 2: 187-195, 1964.
12. JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. Differentiation between *Bothrops nummifer* and *Bothrops picadoi* by means of the biochemical properties of their venoms. *Toxicon*, 4: 300-322, 1967.
13. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature, Lond.* 227: 680, 1970.
14. MINTON, S.A. Observation on toxicity and antigenic make-up of venoms from juvenile snakes. In: RUSSEL, F.E. Saunders, P. R. Animal Toxins. Oxford, Pergamon Press, 1967.
15. MINTON, S.A. A note on the venom of an aged rattlesnake. *Toxicon*, 13: 73-74, 1975.
16. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Caracterisation des venins et standardisation des sérums antivenimeux: progrès réalisés. Genève, 1981. (OMS, Publication off-set n° 58.)

PERRONE, M.A.L.; SILES VILLARROEL, M.; FURTADO, M. de F.D. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná com algumas espécies morfológicamente duvidosas. *Mem. Inst. Butantan*, 51:(1):25-32, 1989.

17. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. In: VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 7. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982.
18. SAINT-GIRONS, H. & DETRAIT, J. Communautés antigéniques des venins et systématique des vipères européennes. Étude immunoelectrophorétique. *Bul. Soc. Zool., France*, 103(2): 155-166, 1978.
19. SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotaline distribution in the same rattlesnake subspecies. *Science*, 129: 1361-1363, 1959.
20. SCHENBERG, S. Immunological (Ouchterlony method) identification of intra subspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon*, 1: 67-75, 1963.
21. SILES VILLARROEL, M. Contribuição ao estudo de serpentes do gênero *Bothrops* (*B.jararaca*, *B.alternatus*, *B.insulares*, *B.jararacussu*, *B.atrox*, *B.cotiara*). São Paulo, 1972 (Tese de Doutorado — Instituto de Ciências Biomédicas, USP).
22. SILES VILLARROEL, M. Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos. São Paulo, 1977 (Tese de Livre-Docência — Instituto de Ciências Biomédicas, USP).
23. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; FURLANETTO, R.S. ROLIM ROSA, R. Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan*, 38: 12-20, 1974.
24. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 42/43: 311-324, 1978/79.
25. TU, A.T. & GANTHAVORN, S. Comparison of *Naja naja siamensis* and *Naja Naja atra* venoms. *Toxicon*, 5: 207-211, 1968.